

福井大学平成22年度重点研究「重点研究育成経費」 スギ花粉症に対する多面的治療戦略の構築

研究代表者： 藤枝 重治（医学部・教授）

共同研究者： 坂下 雅文（医学部・助教）、窪 誠太（医学部・助教）、
伊藤 有未（医学部・医員）、意元 義政（医学部・医員）

概 要	スギ花粉症患者の遺伝子多型による解析から <i>ORMDL3</i> 、 <i>DAF</i> において数カ所にリスクアレルが存在することが判明した。 <i>ORMDL3</i> リスクアレル患者では、CD4 陽性細胞における poly-IC 刺激での IL-17 産生と肥満細胞からのスフィンゴシン 1 リン酸脱顆粒が高いことが判明した。 <i>DAF</i> は、補体 C3 が活性化して C3a（アナフィラトキシン）になるのを抑制するが、スギ花粉症患者では、スギ飛散期に健常人に比べ <i>DAF</i> の mRNA 発現が有意に低下していた。さらに同時期スギ花粉症患者の網羅的蛋白解析で、C3a が有意に増加していた。これまで効果を証明できた舌下免疫療法では、症状が良くなった患者において IL-17、C3a いずれも低値をとることが判明した。今後 IL-17 と補体の関係、 <i>ORMDL3</i> 、 <i>DAF</i> 遺伝子からの治療戦略を構築していく。
関連キーワード	IL-17, C3a, DAF, ORMDL3, 舌下免疫療法

研究の背景および目的

2006 年～2010 年当教室で行った成人 2500 名の疫学調査にて、約 37% がスギ花粉症を発症していることが判明した。それに伴う社会経済的損失、医療支出、QOL の低下は、大問題であり、根治的治療法の確立が急務とされている。我々は新しいスギ花粉症治療として、スギ抗原特異的舌下免疫療法（SLIT）を開発するとともに、スギ花粉症の遺伝的背景や病態を解明することにより新しい治療戦略が描けないか検討してきた。

これまで SLIT は、①奏効率は 60～70%、②

visual analog scale での症状評価は 20% に減少、③40% の症例で内服薬の使用が不要であり、④併用療法による治療期間の短縮や相乗効果が得られる可能性を見出した。さらに臨床効果とアポ蛋白 A-IV 誘導の関連を見出すとともにアポ蛋白 A-IV がヒスタミンの遊離抑制を示すことを見つけ、平成 20 年 3 月 4 日特許出願した。その後、平成 22 年度出願審査請求届出書提出。平成 23 年 1 月「アレルギー疾患の治療薬且つ治療効果のマーカー」（特願 2008-053768, FU271）審査請求した。

研究の内容および成果

スギ花粉症の責任遺伝子を求めるために、スギ花粉症患者 734 名、吸入アレルギー 7 項目がいずれも陰性であり、かつアレルギー疾患の既往ない陰性コントロール 370 名を用いて、一塩基多型（SNP）解析による候補遺伝子アプローチを行った。遺伝子は、小児気管支喘息の全ゲノム解析（GWAS）にて報告された *ORMDL3* 遺伝子に関して 13SNP を解析し検討したところ、9 SNP においてスギ花粉症と有意な相関を認めた。これまで *ORMDL3* はその機能およびリスクアレルの機能がほとんどわかっていなかった。そこで最も相関が得られた rs7216389 部位について検討した。EB ウイルスにより不活化した B 細胞株 70 種類においてアレル別 *ORMDL3* 発現を調べるとリスクアレル TT 型で *ORMDL3* 発現が有意に発現していた。*ORMDL3* 発現は、肝臓、肺、脾臓、甲状腺で発現が高かったが、鼻粘膜上皮が最も高く、鼻線維芽細胞でも発現が認められた。そこで鼻線維芽細胞を用いて、ウイルス感染を模倣して、poly-IC で刺激すると *ORMDL3* の発現が亢進した。LPS, MALP-2 の刺激では *ORMDL3* の発現は変化しなかった。rs7216389 のアレル別 3 群にお

いて末梢血から CD4 陽性細胞を分離し、poly-IC 刺激を行うとリスクアレル TT で IL-17 の産生が有意に高かった。さらに肥満細胞から脱顆粒されたスフィンゴシン 1 リン酸もリスクアレル TT で高値であった。

全ゲノム解析では、一次解析にて 384 SNP に絞られ、二次解析を行い、三次解析として 26 SNP に絞られた。その中で *DAF* に注目し解析を行ったところ、rs10746463 においてリスクアレル A がスギ花粉症と有意な相関を認めた。またプラスミドベクターによるリスクハプロタイプを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ *DAF* の転写が有意に低下した。また *DAF* のプロモーター領域 rs10746463 が A/A になっていると血清中総 IgE とスギ特異的 IgE の両方とも高値であった。これは、rs10746463 が A/A になっていると *DAF* 蛋白の発現が低いことによることが判明した。*DAF* 蛋白は補体 C3 が活性化して C3a（アナフィラトキシン）になるのを抑制するとされている。スギ花粉飛散中に発現が減少する mRNA を末梢血単核球を用いたマイクロアレイにて検討するとスギ花粉症患者では、

健常人に比べ DAF の発現が有意に低下していた。スギ飛散期においてスギ花粉症患者において変動する蛋白を網羅的蛋白解析にて検討すると、C3a が有意に増加していた。

これまで 5 年間行ってきた舌下免疫療法患者において血清中の IL-17 と C3a を測定した。すると 2 ないし 3 年目から両蛋白とも有意に減少していた。さらに臨床相関を調べると症状の visual analogue scale と有意に相関し、症状が良くなった患者において IL-17、C3a いずれも低値をとることが判明した。これまで IL-17 と C3a の関係については、不明であったが、昨年 10 月 Nature Immunology に血清中 C3a が上昇することで IL-23 が上昇し、Th17 細胞に働いて IL-17 が上昇するというマウスで行われた論文が掲載された。このことから舌下免疫療法の指標として、我々はアポ蛋白 A-IV を見出していたが、それ以外にも IL-17 と C3a が治療効果の指標になるとともに効果発現に関与していることを初めて発見した。

次にスギ花粉飛散期に鼻粘膜で本当に IL-17、C3a が働いているのかという疑問が出てくる。そこでスギ花粉飛散期にスギ特異的 IgE 陽性かつスギ花粉症発症者、スギ特異的 IgE 陽性ながらスギ花粉未発症者、スギ特異的 IgE 陰性かつスギ花粉未発症の 3 群で、それぞれ鼻粘膜を擦過し、RNA を抽出後、マイクロアレイを行い、各群で有意な発現の差を認めた因子を同定した。その結果スギ花粉症で Intelectin-1 とその他 17 の遺伝子が有意に変動していることを見出した。Intelectin-1 は鼻粘膜上皮で産生されることが同定でき、スギ花粉症者で高値を示すとともに、非発症者において

も皮内反応陽性 RAST 陽性者でも陰性者に比べ有意発現しており、発症直前に関与する可能性が示唆された。Intelectin-1 は、鼻粘膜を *in vitro* 培養すると発現が消失するが、IL-4、IL-13 刺激によって発現が亢進した。それ以上にスギ花粉飛散期に発現が亢進する遺伝子も存在した（特許申請のため公開せず）。しかし 7 の遺伝子中に IL-17 と C3a は含まれていなかった。つまり単純に血液の中で行われていることと鼻粘膜にて起こっていることに違いがあるのかも知れない。さらなる検討中である。

IL-17 (pg/ml)

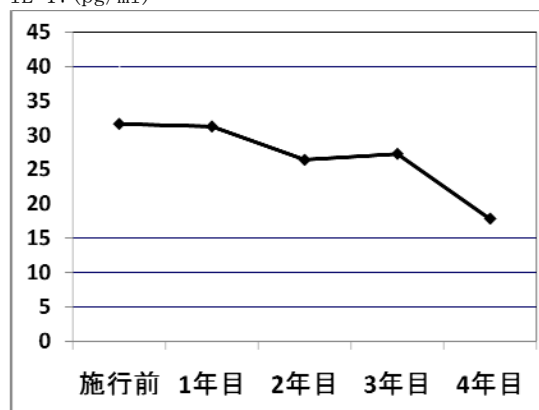


図 1 舌下免疫療法における IL-17 の変動

2年目と3年目は施行前に比較して有意に低下している。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 1) Makino Y, Noguchi E, Takahashi N, Matsumoto Y, Kubo S, Yamada T, Imoto Y, Ito Y, Osawa Y, Shibasaki M, Uchida K, Meno K, Suzuki H, Okubo K, Arinami T, Fujieda S. Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2010, 126(6):1163-9.e5.
- 2) Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E.: S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. J Allergy Clin Immunol. 2010, 125:498-500.
- 3) Yamada T, Lishong S, Takahashi N, Kubo S, Narita N, Suzuki D, Takabayashi T, Kimura Y, Fujieda S.: Poly(I:C) induces BLYS-expression of airway fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase. Cytokine. 2010, 50:163-9.
- 4) Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichi R, Tsunoda T, Osawa Y, Kojima A, Okamoto M, Suzuki D, Kubo S, Imoto Y, Nakamura Y, Tamari M, Fujieda S.: Prevalence of allergic rhinitis

sensitization to common aeroallergens in a

Japanese population. Int Arch Allergy Immunol. 2010, 151:255-61.

- 5) Kimura Y, Sugimoto C, Takabayashi T, Tanaka T, Kojima A, Narita N, Fujieda S.: Bax-gene transfer enhances apoptosis by steroid treatment in human nasal fibroblasts. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2010, 267:61-6.
- 6) Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S.: Upregulation of IL17RB during Natural Allergen Exposure in Patients with Seasonal Allergic Rhinitis. Allergol Int. 2011 in press.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

申請：網羅的解析を組み合わせたスギ花粉症に対する遺伝子多型からの発症予防と治療戦略 平成 23 年度 基盤研究 (B) 代表 藤枝 重治
獲得：スギ花粉症に対する舌下免疫療法施行患者血清中の網羅的解析から得た新薬開発 平成 20 年～22 年 基盤研究 (B) 代表 藤枝 重治